

مقاله پژوهشی

دوپامین تکثیر تاکی زوایت‌های توکسوپلازما را به واسطه تحریک رستورهای دوپامینی شبه D1 تسهیل می‌کند

ستایش یاسمی‌خیابانی، مریم مصطفوی، جلال بابایی*، مجید گل‌کار

گروه انگل‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

پذیرش: ۲ دی ۱۴۰۲

دریافت: ۲ آذر ۱۴۰۲

چکیده

زمینه و هدف: توکسوپلازما گوندی یک انگل درون سلولی اجباری است. توکسوپلازما منجر به افزایش میزان دوپامین در مغز میزبان می‌شود. این احتمال وجود دارد که دوپامین در تکثیر توکسوپلازما نقش داشته باشد. در این مطالعه، اثر دوپامین بر تکثیر تاکی‌زوایت‌های توکسوپلازما در سلول‌های HFF-1 مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: سلول‌های HFF-1 کشت شده و با دوپامین ۵۰۰ نانومولار تیمار شدند. به چاهک‌های حاوی سلول $10^5 \times 4$ تاکی‌زوایت اضافه شد. جهت بررسی نقش گیرنده‌ها، ابتدا سلول‌ها با دوپامین تیمار شدند. آنتاگونیست‌های گیرنده‌های دوپامینی D1 و D2 (به ترتیب SCH-23390 و سولپیراید)، به تنهایی و در ترکیب با هم با غلظت ۱۰ نانومولار به محیط کشت اضافه شدند. سلول‌های تیمار شده با تاکی‌زوایت آلوده شدند. میزان تاکی‌زوایت‌ها با شمارش میکروسکوپ و به روش RT-qPCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: دوپامین به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) تکثیر تاکی‌زوایت‌ها در سلول‌های HFF-1 را افزایش داد. تیمار سلول‌ها با SCH-23390 توانست به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) اثر دوپامین را خنثی کند، درحالی‌که سولپیراید نتوانست از این اثر دوپامین جلوگیری کند. علاوه‌براین، ترکیب دو آنتاگونیست، SCH-23390 و سولپیراید، به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) تکثیر تاکی‌زوایت‌ها در سلول‌های HFF-1 را کاهش داد.

نتیجه‌گیری: مطالعه ما نشان داد که دوپامین تکثیر تاکی‌زوایت‌ها را در رده سلولی HFF-1 تحریک می‌کند. علاوه بر این، دوپامین اثر خود بر تکثیر انگل را از طریق گیرنده‌های D1 اعمال می‌کند. این نتایج می‌تواند به طراحی و توسعه داروهای موثر علیه توکسوپلازما کمک کند.

واژه‌های کلیدی: آنتاگونیست، توکسوپلازما گوندی، دوپامین، HFF-1

مقدمه

نقص ایمنی، فعال‌شدن مجدد کیست‌ها می‌تواند منجر به انسفالیت یا دیگر عوارض کشنده شود. تخمین زده می‌شود که ۳۰ درصد جمعیت جهان سابقه توکسوپلاسموز داشته باشند [۳، ۴].

تحقیقات اخیر نشان داده است که نظرات گذشته در مورد غیرفعال بودن کیست‌های انگل درست نیست. در واقع، روش‌های تصویربرداری میکروسکوپی پیشرفته نشان داده است که برادری‌زوایت‌ها دست کم تا ۸ هفته پس از عفونت در داخل کیست‌های مغزی موش تکثیر می‌شوند [۵]. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که توکسوپلاسموز باعث تغییرات رفتاری از جمله:

توکسوپلازما گوندی انگل درون سلولی اجباری است که قابلیت ایجاد عفونت در تمام حیوانات خونگرم را دارد. مشخصه عفونت حاد حضور تاکی‌زوایت‌های سریع تکثیر شونده در بافت‌های بدن می‌باشد. حدود دو هفته بعد از شروع عفونت، تحت فشار سیستم ایمنی، تاکی‌زوایت‌ها به برادری‌زوایت‌ها تمایز می‌یابند که خیلی آهسته‌تر تکثیر می‌شوند و در بافت‌های تحریک‌پذیری مثل عضلات مخطط، قلب و به خصوص سیستم عصبی مرکزی کیست تشکیل می‌دهند. کیست‌های بافتی توکسوپلازما گوندی اغلب در سیستم عصبی مرکزی انسان به صورت نهفته تا آخر عمر باقی می‌مانند [۱، ۲]. در افراد دارای

۰/۲۵ درصد حاوی EDTA^۹ ۰/۳ درصد (ایده‌زیست نو ترکیب، ایران) به صورت آماده خریداری شدند. دوپامین-هیدروکلراید^۹ (داروسازی کاسپین، ایران) به صورت تازه در محیط کشت DMEM-10 تهیه شده و به محیط اضافه شد. باتوجه به نتایج مطالعات اولیه (داده‌ها ارائه نشده است) برای بررسی تاثیر دوپامین در سلول‌های HFF-1 از غلظت ۵۰۰ نانومولار استفاده شد. سولپیراید^{۱۰} (سیگما) ابتدا به صورت محلول استوک در اسید استیک تهیه شده و در محیط کشت رقیق شد [۱۳] و SCH-23390^{۱۱} (سیگما) در محیط کشت حل شد [۱۶-۱۴]. SCH-23390 و سولپیراید با غلظت نهایی ۱۰ نانومولار استفاده شدند.

تهیه تاکی‌زوایت

مایع صفاقی حاوی تاکی‌زوایت‌های سوش RH^{۱۲} توکسوپلازما گوندی^۹ از بخش انگل‌شناسی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سویه RH که در موش‌ها به شدت کشنده می‌باشد به دودمان تیپ I^{۱۳} انگل تعلق دارد. برای خالص‌سازی تاکی‌زوایت‌ها از هر دو روش تهیه از موش آلوده و کشت آزمایشگاهی استفاده می‌شود [۱۷]. به‌طور خلاصه، ۲۵ میلی‌لیتر محلول (۴۵ درصد V/V) پرکول با استفاده از بافر نمکی فسفات (PBS)^{۱۴} درست شد. ۵ میلی‌لیتر مایع صفاقی در لوله‌های سانتریفیوژ ۵۰ میلی‌لیتری به دقت روی محلول پرکول قرار داده شده و در دور ۴۵۰ فورس جی به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب در ۵ میلی‌لیتر PBS معلق شده و دوباره به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در انتها، رسوب حاصل در ۵ میلی‌لیتر FBS پخش شد. تعداد تاکی‌زوایت با استفاده از لام نئوبار و با استفاده از عدسی شیئی ۴۰ برابر میکروسکوپ نوری شمارش شده و در نهایت به آن ۷ درصد از DMSO اضافه شده و در ۸۰- سانتی گراد نگهداری شد.

کشت سلول‌های HFF-1

استوک سلول HFF-1 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. HFF-1 با محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS به یک فلاسک T25 منتقل شد و پس از رسیدن به تراکم به یک فلاسک T75 منتقل شد.

خطرپذیری، افزایش میزان فعالیت و کاهش قدرت حافظه در حیوانات می‌شود [۹-۶]. به‌خوبی مشخص شده است که سیگنالینگ دوپامین در حین عفونت توکسوپلازما زیاد می‌شود. در اولین مطالعات مربوط به تاثیر عفونت بر عملکرد نورون‌ها نشان داده شد که در فاز مزمن عفونت، میزان دوپامین ۱۴ درصد بیشتر از موش‌های غیر آلوده است [۱۰]. مطالعه پراندوسکی^۱ و همکاران نشان داد که توکسوپلازما منجر به افزایش معنی‌دار در متابولیسم دوپامین سلول‌های عصبی می‌گردد [۱۱]. توکسوپلازما دو آنزیم هیدروکسیلاز اسید آمینه آروماتیک^۲ دارد [۱۲]. این آنزیم‌ها تبدیل تیروزین به پیش‌ساز دوپامین، یعنی ال-دوپا^۳ را کاتالیز می‌کنند.

سلول‌های فیبروبلاستی انسان به‌عنوان یک مدل کشت سلولی مناسب برای تکثیر فرم‌های مختلف انگل از جمله تاکی‌زوایت در نظر گرفته می‌شوند. این احتمال وجود دارد که دوپامین در تکثیر توکسوپلازما نقش داشته باشد. از این رو در تنها مطالعه انجام شده نقش دوپامین در تکثیر تاکی‌زوایت مورد ارزیابی قرار گرفت و با آنتاگونیزه کردن^۴ جداگانه گیرنده‌های دوپامینی اینطور نتیجه‌گیری شد که دوپامین منجر به تسهیل آلودگی سلول فیبروبلاست ختنه‌گاه انسان (HFF-1)^۵ به توکسوپلازما می‌شود. همچنین نتیجه‌گیری شد که اثر دوپامین در تسهیل عفونت توکسوپلازما به واسطه رسپتورهای دوپامینی نیست [۱۳]. ولی ایرادی که به این مقاله وارد است این است که این امکان وجود دارد که دوپامین از طریق هر دو رسپتورهای D1 و D2 اثر خود را در این مدل اعمال کند و آنتاگونیزه کردن جداگانه D1 و یا D2 منجر به مسدود شدن کامل اثر دوپامین در افزایش تکثیر انگل نشود. با این فرض، نقش دوپامین و گیرنده‌ها در تکثیر تاکی‌زوایت‌های توکسوپلازما در این مطالعه مورد ارزیابی مجدد قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد و داروها

محیط کشت کامل DMEM^۶، FBS^۷ و محلول تریپسین

⁹ Dopamine hydrochloride

¹⁰ (-) sulpiride

¹¹ R(+)-SCH-23390 hydrochloride

¹² RH strain

¹³ Lineage type I

¹⁴ Phosphate-buffered saline (PBS)

¹ Prandovszky

² *T. gondii* aromatic amino acid hydroxylase

³ L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)

⁴ Antagonize

⁵ Human foreskin fibroblasts

⁶ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

⁷ Fetal bovine serum

⁸ Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

بررسی اثر سمی داروها روی سلول‌های HFF-1

سلول HFF-1 در پلیت ۲۴ خانه حاوی DMEM-10، دارای پن-استرپ^{۱۵} کشت شد تا به تراکم حدود ۹۰ درصد برسد. برای این منظور، ۴۰ هزار سلول HFF-1 به هر چاهک پلیت اضافه شده و به مدت ۳ روز در انکوباتور دی‌اکسیدکربن (۵ درصد) قرار داده شد. در روز سوم تاکی‌زوایت سوش RH از فریزر ۸۰- درجه خارج شده و پس از شستشو، به نسبت‌های ۱، ۲، ۵ و ۱۰ برابری (نسبت به تعداد سلول) اضافه شد. طی ۷ تا ۸ روز بعدی هر روز سلول‌ها در زیر میکروسکوپ اینورت مورد بررسی قرار گرفتند. برای بررسی مولکولی، به صورت یک روز در میان ۳ چاهک کنار هم به روش خراشیدن جمع‌آوری شده و در دمای ۸۰- سانتی‌گراد نگهداری شد.

بررسی تاثیر داروهای مختلف مورد مطالعه بر رشد سلول‌ها

جهت ارزیابی اثر سمی احتمالی دوپامین، SCH-23390 و سولپیراید روی سلول‌های HFF-1، تست بیواسی با استفاده از روش ام‌تی‌تی^{۱۶} انجام پذیرفت. روش رنگ سنجی ام‌تی‌تی به‌عنوان شاخصی از عملکرد میتوکندری در سلول‌های زنده استفاده می‌شود [۱۸]. برای این منظور، ۳۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه در محیط کشت DMEM-10 کشت داده شد و برای سه روز در انکوباتور انکوبه شد. روز سوم محیط کشت رویی خارج شده و محیط کشت جدید حاوی غلظت‌های ۱ تا ۱۰۰۰۰۰ نانومولار (۱۰ برابری) از هر دارو اضافه شد. برای هر غلظت از داروها ۳ تکرار در نظر گرفته شد. بعد از گذشت سه روز آزمایش ام‌تی‌تی روی پلیت انجام گرفت. به‌طور خلاصه، محیط آسپیره شد و با ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی ام‌تی‌تی جایگزین شده و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور دی‌اکسیدکربن (۵ درصد) قرار داده شد. محیط حاوی ام‌تی‌تی خارج شده و ۲۰۰ میکرولیتر DMSO در هر چاهک اضافه شد. جذب نوری پلیت در ۵۷۰ نانومتر بوسیله ریدر (بیوتک^{۱۷}) اندازه‌گیری شد. در انتها میزان جذب نوری در چاهک‌های حاوی ماده مورد آزمایش با چاهک‌های حاوی سلول‌های کنترل مقایسه شد.

بررسی نقش دوپامین در آلوده‌شدن HFF-1 با تاکی‌زوایت

برای این منظور پلیت کشت ۲۴-خانه با تک‌لایه سلولی HFF-1 متراکم شد. برای تیمار سلول با دوپامین ابتدا محیط کشت از چاهک‌ها خارج شده و دوپامین به صورت تازه با غلظت ۵۰۰ نانومولار در DMEM-10 تهیه شده و به چاهک‌ها اضافه شد. بعد از مرحله تیمار، یک میلیون تاکی‌زوایت تازه تهیه شده در محیط کشت DMEM-10 به هر چاهک اضافه شده و برای ۲ ساعت در انکوباتور دی‌اکسیدکربن برای ورود تاکی‌زوایت‌ها انکوبه شد. در مرحله بعد همه محیط رویی خارج شد تا تاکی‌زوایت‌های وارد نشده به همراه باقی مانده دوپامین از محیط خارج شود. محیط تازه DMEM-10 اضافه شده و ۳ روز پس از تیمار سلول‌ها از کف پلیت جدا شدند. برای شمارش تاکی‌زوایت‌ها در میکروسکوپ نوری، نمونه‌های ۱۰۰ میکرولیتری از هر سوسپانسیون برداشت شد و مابقی بعد از رسوب‌دهی برای بررسی مولکولی (RT-qPCR^{۱۸}) در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بررسی نقش گیرنده‌های دوپامینی در تسریع آلودگی القاشده با دوپامین

پلیت کشت ۲۴-خانه با تک‌لایه سلولی HFF-1 متراکم شد. برای تیمار سلول‌ها با دوپامین ابتدا محیط کشت از چاهک‌ها خارج شده و دوپامین بصورت تازه با غلظت ۵۰۰ نانومولار در DMEM-10 تهیه شده و به چاهک‌ها اضافه شد. بعد از مدت ۱۵ دقیقه، هر یک از داروهای SCH-23390، سولپیراید و ترکیب آن‌ها به محیط کشت اضافه شد. باتوجه به نتایج مطالعات اولیه (داده‌ها ارائه نشده است)، سلول‌ها با غلظت نهایی ۱۰ نانومولار داروها تیمار شدند. در کنار هر دارو کنترل حلال نیز در نظر گرفته شد. همچنین کوتریماکسازول (یکی از لاین‌های دارویی درمانی ضد توکسوپلازما) هم به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. تیمار با آنتاگونیست‌ها به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. بعد از تیمار با آنتاگونیست‌ها، یک میلیون تاکی‌زوایت به هر چاهک اضافه شد. پلیت کشت برای ۲ ساعت در انکوباتور دی‌اکسیدکربن برای ورود انگل‌ها انکوبه شد. در مرحله بعد، همه

¹⁷ BioTek

¹⁸ Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR)

¹⁵ Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep)

¹⁶ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)

سانتی‌گراد به ترتیب به مدت ۱۰ و ۳۰ ثانیه برای تکثیر و گزارش فلورسنس واکنش اعمال شد. برای رسم منحنی استاندارد و تعیین دقیق مقادیر توالی REP-529 از نرم افزار ترموسایکلر (استپ وان^{۲۲}) استفاده شد.

آنالیز آماری

تفاوت در میزان رشد انگلی با استفاده از آزمون تفاوت (Unpaired Student t test) 2-tailed مقایسه شد. در تمامی آزمون‌ها مقدار $p < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. در صورت استفاده از ترکیب داروها، برای تجزیه و تحلیل آماری، از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون تکمیلی توکی برای شناسایی سطح اثر متقابل داروها استفاده شد.

یافته‌ها

دوره زمانی عفونت سلول‌های HFF-1 با تاکی‌زوایت

نتایج آلوده‌سازی با تاکی‌زوایت نشان داد که در نسبت‌های ۱، ۲ و ۵ (انگل به سلول) قبل از آنکه تاکی‌زوایت‌ها عمده سلول‌ها را آلوده کنند سلول‌ها وارد فاز مرگ‌ومیر شده و از بین می‌روند. از این رو نسبت ۱۰ برابری تاکی‌زوایت به سلول در همه مراحل بعدی مطالعات برای آلوده‌سازی سلول‌ها انتخاب شد (داده‌ها ارائه نشده است). بررسی روند آلودگی در HFF-1 نشان داد که از روز سوم تا هفت روز بعد از شروع عفونت، تکثیر تاکی‌زوایت به‌طور معنی‌داری ($p < 0.0001$) نسبت به روز اول افزایش پیدا می‌کند (نمودار ۱). با نگاه کلی به نمودار رشد سلولی در دوره رشد یک هفته‌ای تفاوت چشم‌گیر در میزان رشد تاکی‌زوایت‌ها در رده سلولی HFF-1 مشاهده می‌شود.

داروهای مورد مطالعه در غلظت‌های بالا تاثیر منفی در رشد سلول HFF-1 دارند.

نتایج نشان داد که دوپامین (آگونیست گیرنده‌های دوپامین) و سولپیراید (آنتاگونیست انتخابی گیرنده‌های D2 دوپامین) حتی در غلظت‌های خیلی بالا تاثیر معنی‌داری ($p > 0.05$) در رشد و

محیط رویی خارج شد و محیط تازه DMEM-10 اضافه شد تا تاکی‌زوایت‌های وارد نشده به همراه باقی مانده داروها از محیط خارج شود. سه روز پس از تیمار، سلول‌ها از کف پلیت جدا شده و برای بررسی مولکولی (RT-qPCR) در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تایید آلودگی با تاکی‌زوایت و بررسی شدت آلودگی

برای تایید آلودگی با انگل و همچنین بررسی شدت آلودگی از روش RT-qPCR استفاده شد. برای این منظور، نمونه‌ها از فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد خارج شده و بعد از هموژن شدن، تخلیص DNA ژنومی با استفاده از کیت (فیورژن^{۱۹}) انجام شد. تعیین غلظت نمونه DNA های خالص شده با ریدر (سینرژ^{۲۰})، بیوتک^{۲۰} و پلیت Take3 (بیوتک) انجام گرفت. DNA توتال جهت بررسی وجود عفونت و شدت آن در روش RT-qPCR استفاده شد. در این روش از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) توالی تکراری ژنوم توکسوپلازما (REP-529) استفاده شد [۲]. به‌طور خلاصه، برای تهیه واکنش ۲۵ میکرولیتری: ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط اصلی آمپلیکون (RealQ Plus 2x Master Mix)، ۱ میکرولیتر (۰/۴ میکرومول) از هر پرایمر پیشرو و معکوس، و همچنین ۰/۳ میکرولیتر (۰/۱۲ میکرومول) پروب (جدول ۱) به همراه ۱ میکرولیتر DNA ژنومی (۲۰ نانوگرم) اضافه شد. در تیوپ‌های استاندارد به جای DNA ژنومی، پلاسمید حاوی توالی REP-529 با رقت‌های $10^2 \times 1$ ، $10^3 \times 1$ ، $10^5 \times 1$ و $10^7 \times 1$ اضافه گردید. برای انجام واکنش آنزیمی PCR از دستگاه ترموسایکلر^{۲۱} استفاده شد.

جهت واکنش آنزیمی RT-qPCR، سیکل ابتدایی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. سپس ۴۰ سیکل دو مرحله‌ای در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۶۰ درجه

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در RT-qPCR

نام پرایمر (REP-529)	توالی
پیشرو	5'- CTCGCCTTCATCTACAGTCCTG-3'
معکوس	5'- GAGCCACAGAAGGGACAGAAG-3'
پروپ	5'- ROX-GATGCCGCTCCTCCAGCCGCT-BHQ2-3'

¹⁹ FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit

²⁰ Synerg, BioTek

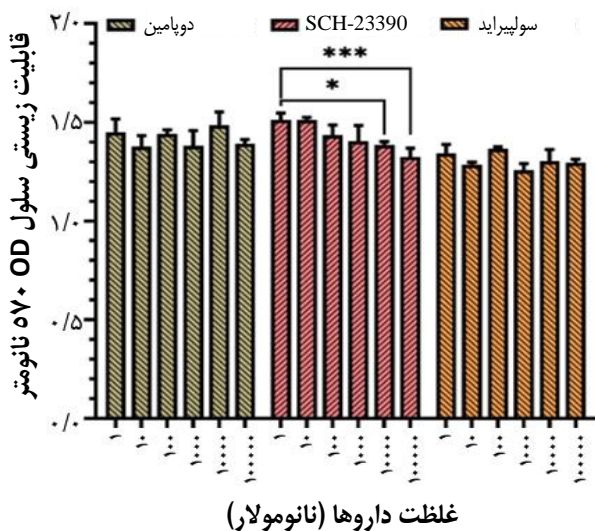
²¹ StepOnePlus™ Real-Time PCR System

²² StepOne v2.3

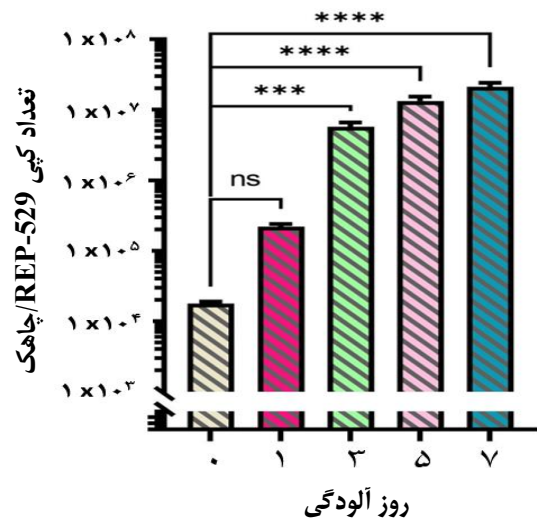
گیرنده‌های D1 دوپامین در تسریع عفونت القا شده با دوپامین نقش ایفا می‌کنند.

همان‌طور که در قسمت قبلی گزارش شد دوپامین منجر به تسهیل آلودگی به تاکی‌زویت شد. برای بررسی این که آیا این تاثیر ناشی از مکانیسم‌های مولکولی گیرنده‌های دوپامینی می‌باشد و یا اینکه به واسطه مسیرهای دیگر سلولی می‌باشد گیرنده‌های یاد شده با آنتاگونیست‌های انتخابی مسدود شده و تاثیر این انسداد بررسی شد.

نتایج نشان داد که حضور کوتریماکسازول به طور معنی‌داری منجر به کاهش تکثیر انگل در HFF-1 ($P < 0.01$) می‌شود. همچنین آنتاگونیست گیرنده D1 (SCH-23390) به طور معنی‌داری منجر به کاهش رشد و تکثیر تاکی‌زویت در HFF-1 ($p < 0.05$) شد. با این حال، آنتاگونیست گیرنده D2 (سولپیراید) هر چند به طور جزئی منجر به کاهش رشد و تکثیر تاکی‌زویت در رده سلولی HFF-1 شد اما این کاهش معنی‌دار نبود. همچنین ترکیب دو آنتاگونیست یاد شده (SCH-23390 و سولپیراید) به طور معنی‌داری منجر به کاهش رشد و تکثیر تاکی‌زویت در سلول HFF-1 ($p < 0.05$) شد (نمودار ۴).



نمودار ۲- داروهای مورد مطالعه در دوزهای بالا منجر به کاهش رشد HFF-1 می‌شوند. با استفاده از تکنیک ام‌تی‌تی تاثیر داروهای دوپامین، SCH-23390 و سولپیراید روی رشد رده سلولی HFF-1 ارزیابی شد. پلات‌ها نشان‌دهنده میانگین \pm انحراف معیار (mean \pm SD) ۳ تکرار می‌باشد (ANOVA دوطرفه، تست Tukey): * $p < 0.05$ و *** $p < 0.001$.



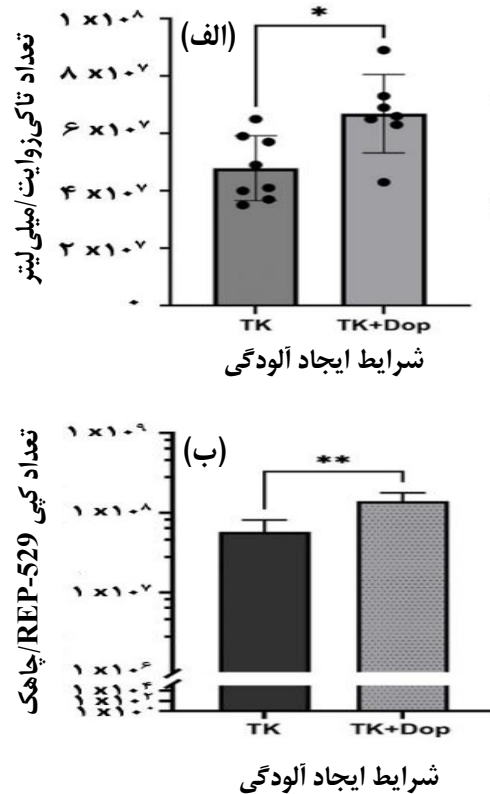
نمودار ۱- دوره زمانی عفونت سلول‌های HFF-1 با تاکی‌زویت‌های سویه RH. نمودارها میانگین \pm SEM را نشان می‌دهند. ANOVA یک‌طرفه، تست Tukey) ns: معنی‌دار نیست، ***: $p < 0.001$ و ****: $p < 0.0001$.

تکثیر رده سلولی HFF-1 ندارند (نمودار ۲). با این حال SCH-23390 (آنتاگونیست انتخابی گیرنده‌های D1 دوپامین) در غلظت بالاتر از ۱۰۰۰ نانومولار به طور معنی‌داری اثرات سمی داشته و منجر به کاهش رشد سلول می‌شود (نمودار ۲). با توجه به نتایج فوق تصمیم گرفته شد دوپامین در تمامی آزمایشات با غلظت ۵۰۰ نانومولار و سایر داروها با غلظت ۱۰ نانومولار استفاده شود.

دوپامین در سلول‌های HFF-1 منجر به تسهیل عفونت به تاکی‌زویت می‌شود.

نتایج شمارش تعداد تاکی‌زویت با استفاده از مشاهده مستقیم تاکی‌زویت در زیر میکروسکوپ نوری بوسیله لام نتوبار نشان داد که دوپامین در سلول HFF-1 تاثیر معنی‌داری ($p < 0.05$) در رشد و تکثیر تاکی‌زویت داشته است به طوری که تعداد تاکی‌زویت در سلول‌های تیمار شده با دوپامین ۱/۴ برابر بیشتر از سلول‌هایی بود که دوپامین دریافت نکرده بودند (نمودار ۳الف). همچنین نتایج RT-qPCR نشان داد که دوپامین تاثیر معنی‌داری ($p < 0.01$) در رشد و تکثیر تاکی‌زویت در سلول HFF-1 داشته است به طوری که مقادیر توالی تکراری ژنومی در سلول‌های تیمار شده با دوپامین ۲/۴۳ برابر بیشتر از سلول‌هایی بود که دوپامین دریافت نکرده بودند (نمودار ۳ب).

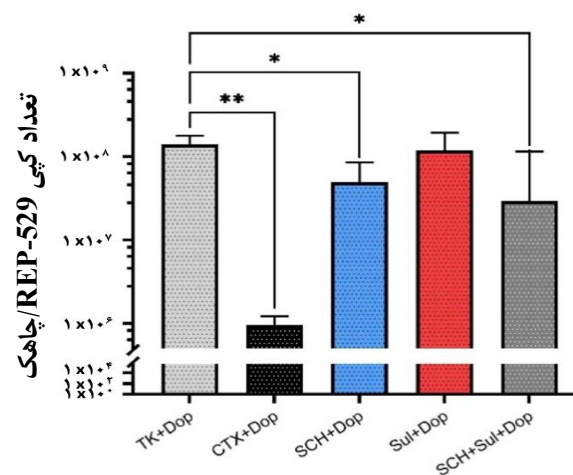
نتایج نشان داد که دوپامین بطور معنی‌داری منجر به تسهیل عفونت با فرم تاکی‌زوایت انگل و افزایش رشد و تکثیر آن می‌شود. توکسوپلازما در انواع رده‌های سلولی در کیفیت و کمیت‌های متفاوت کشت شده است. چندین مطالعه گزارش کرده‌اند که فرم تاکی‌زوایت توکسوپلازما، از جمله تاکی‌زوایت سوش RH، در سلول‌های HFF-1 سریعتر و بهینه‌تر تکثیر می‌شوند [۲۰، ۱۹]. در مطالعه ما هم تاکی‌زوایت در سلول HFF-1 به راحتی تکثیر شد. با اضافه‌شدن دوپامین به محیط کشت، عفونت در سلول HFF-1 به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. به مانند مطالعه ما، در تنها مطالعه انجام‌شده در زمینه نقش دوپامین در تسهیل عفونت توکسوپلازما، افزودن دوپامین به محیط کشت سلول‌های فیبروبلاستی انسانی و یا آستروسیت اولیه موش صحرایی نوزاد، منجر به تسهیل عفونت و افزایش معنی‌دار تعداد تاکی‌زوایت‌های تولیدی و تخریب بیشتر تک لایه-ی سلولی شده بود. در مطالعه یاد شده برای بررسی نقش گیرنده‌های دوپامینی در تسهیل عفونت سلول‌ها به تاکی‌زوایت، هر یک از گیرنده‌های D1 و D2 به‌تنهایی آنتاگونیست شده و در نهایت نتیجه‌گیری شده بود که این گیرنده‌ها نقشی در تسهیل عفونت ندارند [۱۳]. برخلاف مطالعه استرابل [۱۳]، نتایج



نمودار ۳- دوپامین منجر به تسهیل آلودگی HFF-1 با تاکی‌زوایت می‌شود. (الف) شمارش تعداد تاکی‌زوایت در هر میلی‌لیتر از کشت: شمارش با استفاده از مشاهده مستقیم تاکی‌زوایت در زیر میکروسکوپ نوری بوسیله لام نئوبار انجام گرفت. (ب) بررسی مولکولی شدت آلودگی: با استفاده از تکنیک RT-qPCR شدت آلودگی به تاکی‌زوایت ۳ روز بعد از عفونت نسبت به گروه کنترل مقایسه شد. TK: تاکی‌زوایت، TK + Dop: تاکی‌زوایت به همراه دوپامین. پلات‌ها نشان‌دهنده میانگین \pm انحراف معیار (mean \pm SD) ۵ تا ۹ تکرار می‌باشند. ANOVA یک‌طرفه و تست (Tukey). *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.

بحث

در این مطالعه اثر دوپامین و نقش آن در عفونت سلولی به‌وسیله توکسوپلازما در مدل کشت سلولی مورد بررسی قرار گرفت. کشت تاکی‌زوایت سوش RH با موفقیت در رده سلولی HFF-1 انجام شده و شرایط آن بهینه گردید. اثر دوپامین، SCH-23390 و سولپیراید روی رشد و تکثیر سلول HFF-1 مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس اثر دوپامین و نقش رسپتورهای دوپامینی، در عفونت توکسوپلازما گوندی مورد ارزیابی قرار گرفت.



نمودار ۴- گیرنده‌های دوپامین در تسهیل آلودگی به تاکی‌زوایت القا شده با دوپامین نقش ایفا می‌کنند. با استفاده از تکنیک RT-qPCR شدت آلودگی به تاکی‌زوایت طی ۲۴ ساعت بعد از تیمار با آنتاگونیست گیرنده‌های دوپامینی نسبت به هم مقایسه شد. TK: تاکی‌زوایت، Dop: دوپامین، CTX: کوتریماکسازول، SCH: SCH-23390، Sul: سولپیراید. پلات‌ها نشان‌دهنده میانگین \pm انحراف معیار (mean \pm SD) ۵ تکرار می‌باشد (ANOVA یک‌طرفه، تست توکی). *: $p < 0.05$ و **: $p < 0.01$.

نتیجه گیری

مطالعات گذشته نشان داده بود که مقادیر ترشح و سیگنالینگ دوپامین بعد از عفونت حاد و مزمن با توکسوپلازما گوندی افزایش پیدا می‌کند. مطالعه حاضر نشان داد که یکی از اثرات این افزایش مقادیر دوپامین، تغییر سیگنالینگ مسیرهای ورود به داخل سلول می‌باشد به نحوی که انگل به واسطه تحریک رسپتورهای دوپامینی شبه D1 موجود در غشا سلول، ورود و تکثیر خود در داخل سلول را تسهیل می‌کند. مطالعه حاضر گامی در جهت روشن شدن نقش دوپامین و گیرنده‌های آن در افزایش عفونت توکسوپلازما در سلول‌های هدف بود. باین حال برای روشن شدن نقش دقیق دوپامین در رشد و تکثیر توکسوپلازما نیاز به بررسی سایر مکانیسم‌های سلولی می‌باشد.

ملاحظات مالی

پژوهش حاضر تحت حمایت مالی انستیتو پاستور ایران با شماره طرح ۱۲۷۹ انجام شده است.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

س.ی.خ: انجام مطالعه، جمع‌آوری داده‌ها و نگارش مقاله؛
م.م: انجام مطالعه و جمع‌آوری داده‌ها؛ ج.ب: طراحی و انجام مطالعه، نظارت بر اجرای پژوهش، آنالیز داده‌ها و نگارش مقاله؛
م.گ: مشاوره و راهنمایی اجرای پژوهش.

فهرست منابع

- [1] Tan K, Current protocols in immunology. In: Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Warren Strober S, eds, Cell Biochemistry and Function. New York: John Wiley and Sons, 9 (1991) 295-295.
- [2] Babaie J, Sayyah M, Fard-Esfahani P, Golkar M, Gharagozli K, Contribution of dopamine neurotransmission in proconvulsant effect of Toxoplasma gondii infection in male mice. *J Neurosci Res* 95 (2017) 1894-1905.
- [3] Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP, Biology and epidemiology of Toxoplasma gondii in man and animals. *Anim Health Res Rev* 6 (2005) 41-61.

مطالعه ما نشان داد که مسدود کردن گیرنده‌های نوع D1 به وسیله آنتاگونیست انتخابی خود (SCH-23390) منجر به کاهش تکثیر تاکی‌زوایت‌ها و مسدود شدن کامل اثر دوپامین می‌شود. استرابل و همکاران برای مسدودسازی گیرنده D1 از غلظت ۱۰ میکرومولار SCH-23390 استفاده کرده بودند در حالی که در مطالعه ما از غلظت ۱۰ نانومولار استفاده شد که ۱۰۰۰ برابر کمتر بود. چنان که در نتایج مشاهده شد غلظت بالای این دارو منجر به کاهش رشد سلول HFF-1 می‌شود. بنابراین یکی از دلایل نتایج متناقض دو مطالعه می‌تواند استفاده از مقادیر بالای آنتاگونیست در مطالعه استرابل باشد.

برخلاف نتایج حاصل از مسدودسازی گیرنده‌های نوع D1 با SCH-23390، مسدود کردن گیرنده‌های نوع D2 با سولپیراید تاثیر معنی‌داری در کاهش تکثیر نداشت. همچنین آنتاگونیزه کردن توام D1 و D2 با ترکیب دو آنتاگونیست منجر به مسدود شدن کامل اثر دوپامین در افزایش تکثیر انگل شد. این اثر می‌تواند ناشی از مسدود شدن گیرنده‌های نوع D1 بوده باشد. همچنین سایر گیرنده‌های سلولی می‌توانند در این اثر نقش داشته باشند. مطالعات قبلی بر روی سلول J774 نشان داده است که دوپامین علاوه بر گیرنده‌های دوپامینی به سایر گیرنده‌های سطح سلول از جمله گیرنده‌های بتا آدرنرژیک متصل می‌شوند [۲۱]. دوپامین با اتصال به گیرنده‌های بتا آدرنرژیک منجر به کاهش تولید اینترلوکین ۱۲ و متعاقباً منجر به اثرات ضدالتهابی متعددی می‌شود که توسط مکانیسم وابسته و مستقل به گیرنده‌های D اعمال می‌شود. بنابراین شاید یکی از مکانیسم‌های سلولی دخیل در نقش تسهیل کننده دوپامین روی تکثیر تاکی‌زوایت، اثرات ضدالتهابی دوپامین باشد.

- [4] Sutherland AL, Kuin A, Kuiper B, van Gool T, Leboyer M, Fond G, de Haan L, Driving us mad: the association of Toxoplasma gondii with suicide attempts and traffic accidents - a systematic review and meta-analysis. *Psychol Med* 49 (2019) 1608-1623.
- [5] Watts E, Zhao Y, Dhara A, Eller B, Patwardhan A, Sinai AP, Novel approaches reveal that toxoplasma gondii bradyzoites within tissue cysts are dynamic and replicating entities in vivo. *mBio* 6 (2015) e01155-01115.
- [6] Hay J, Aitken PP, Graham DI, Toxoplasma infection and response to novelty in mice. *Z Parasitenkd* 70 (1984) 575-588.
- [7] Hutchinson WM, Bradley M, Cheyne WM, Wells BW, Hay J, Behavioural abnormalities in Toxoplasma-infected mice. *Ann Trop Med Parasitol* 74 (1980) 337-345.

- [8] Johnson HJ, Koshy AA, Latent Toxoplasmosis effects on rodents and humans: How much is real and how much is media hype? *mBio* 11 (2020) e02164-19.
- [9] Meyer CJ, Cassidy KA, Stahler EE, Brandell EE, Anton CB, Stahler DR, Smith DW, Parasitic infection increases risk-taking in a social, intermediate host carnivore. *Commun Biol* 5 (2022) 1180.
- [10] Stibbs HH, Changes in brain concentrations of catecholamines and indoleamines in *Toxoplasma gondii* infected mice. *Ann Trop Med Parasitol* 79 (1985) 153-157.
- [11] Prandovszky E, Gaskell E, Martin H, Dubey JP, Webster JP, McConkey GA, The neurotropic parasite *Toxoplasma gondii* increases dopamine metabolism. *PLoS One* 6 (2011) e23866.
- [12] Gaskell EA, Smith JE, Pinney JW, Westhead DR, McConkey GA, A unique dual activity amino acid hydroxylase in *Toxoplasma gondii*. *PLoS One* 4 (2009) e4801.
- [13] Strobl JS, Goodwin DG, Rzigalinski BA, Lindsay DS, Dopamine stimulates propagation of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in human fibroblast and primary neonatal rat astrocyte cell cultures. *J Parasitol* 98 (2012) 1296-1299.
- [14] Schmidt M, Imbs JL, Giesen EM, Schwartz J, Blockade of dopamine receptors in the renal vasculature by isomers of flupenthixol and sulpiride. *J Cardiovasc Pharmacol* 5 (1983) 86-89.
- [15] Nilsson CL, Ekman A, Hellstrand M, Eriksson E, Inverse agonism at dopamine D2 receptors. Haloperidol-induced prolactin release from GH4C1 cells transfected with the human D2 receptor is antagonized by R(-)-n-propylnorapomorphine, raclopride, and phenoxybenzamine. *Neuropsychopharmacology* 15 (1996) 53-61.
- [16] Gaskill PJ, Yano HH, Kalpana GV, Javitch JA, Berman JW, Dopamine receptor activation increases HIV entry into primary human macrophages. *PLoS One* 9 (2014) e108232.
- [17] Hassl A, Aspöck H, A rapid and simple method of purification of *Toxoplasma gondii* trophozoites originating from tissue culture for use in the indirect immunofluorescent antibody test. *Zentralbl Bakteriol* 272 (1990) 509-513.
- [18] Ehrlich M, Sharova L, In vitro methods for detecting cytotoxicity. *Curr Protoc Toxicol* 2 (2001) Unit 2.6.
- [19] Wu L, Zhang QX, Li TT, Chen SX, Cao JP, In vitro culture of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in HFF and HeLa cells. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 27 (2009) 229-231 [in Chinese].
- [20] da Costa-Silva TA, da Silva Meira C, Frazzatti-Gallina N, Pereira-Chioccola VL, *Toxoplasma gondii* antigens: recovery analysis of tachyzoites cultivated in Vero cell maintained in serum free medium. *Exp Parasitol* 130 (2012) 463-469.
- [21] Hasko G, Szabo C, Nemeth ZH, Deitch EA, Dopamine suppresses IL-12 p40 production by lipopolysaccharide-stimulated macrophages via a beta-adrenoceptor-mediated mechanism. *J Neuroimmunol* 122 (2002) 34-39.

Research paper

Dopamine facilitates toxoplasma tachyzoite replication
by stimulating D1-like dopamine receptors

Setayesh Yasami-Khiabani, Maryam Mostafavi, Jalal Babaie*, Majid Golkar

Department of Parasitology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Received: 23 November 2023

Accepted: 23 December 2023

Abstract

Background and Aim: *Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular parasite. *T. gondii* leads to increased production of dopamine in the host's brain. It is possible that dopamine plays a role in the proliferation of *T. gondii*. In this study, the effect of dopamine on the proliferation of *Toxoplasma* tachyzoites in HFF-1 cells was investigated.

Methods: HFF-1 cells were cultured and treated with 500 nM dopamine. 4×10^5 tachyzoites were added to the cell wells. To investigate the role of receptors, first the confluent cells were treated with dopamine. Dopamine D1 and D2 receptor antagonists (SCH-23390 and sulpiride, respectively), alone and in combination, were added to the culture medium at a concentration of 10 nM. The treated cells were infected with Tachyzoite. The amounts of tachyzoites were evaluated by microscopic counting and by RT-qPCR method.

Results: Dopamine significantly ($p < 0.05$) increases proliferation of tachyzoites in HFF-1 cells. SCH-23390 significantly neutralized the effect of dopamine in treated cells ($p < 0.05$), while sulpiride could not avert the effect of dopamine. Moreover, combination of two antagonists, SCH-23390 and sulpiride, significantly reduced the proliferation of tachyzoites in HFF-1 cells ($p < 0.05$).

Conclusion: Our study showed that dopamine stimulates proliferation of tachyzoites in HFF-1 cell line. In addition, dopamine exerts its effect on parasite proliferation through D1 receptors. These results can help to design and develop effective drugs against *Toxoplasma*.

Keywords: Antagonist, dopamine, HFF-1, *Toxoplasma gondii*

Please cite this article as follows:

Yasami-Khiabani S, Mostafavi M, Babaie J, Golkar M, Dopamine Facilitates *Toxoplasma* Tachyzoite Replication by Stimulating D1-Like Dopamine Receptors. *Iran J Physiol Pharmacol* 7 (2023) 178-186.

*Corresponding author: jalalbabaie@gmail.com (ORCID ID: 0000-0002-4989-5998)